

平成22年 3月19日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20880031  
 研究課題名（和文） ロドコッカス属細菌における難分解性環境汚染物質分解制御系の網羅的解析  
 研究課題名（英文） Genome wide localization analysis of BphT1 binding region on *Rhodococcus jostii* RHA1.  
 研究代表者  
 原 啓文 (HARA HIROFUMI)  
 岡山理科大学・工学部・講師  
 研究者番号：80511071

研究成果の概要（和文）：ビフェニル分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 株は2成分制御系 BphT1S1 によるビフェニル分解酵素系の転写活性化により PCB などの難分解性環境汚染物質を分解する能力を有する。本研究では、BphT1 によって活性化される ORF を ChIP-chip を用いて網羅的に解析した。その結果、BphT1 はビフェニル分解酵素以外の遺伝子発現の転写活性化を行っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：*Rhodococcus jostii* RHA1 was grown on a broad range of aromatic compounds and vigorously degrades polychlorinated biphenyls (PCBs). Two-component signal transduction system, BphT1T2, is necessary for activation of biphenyl degradation genes in *R. jostii* RHA1. In this study, we performed global chromatin immunoprecipitation-on-chip (ChIP-chip) analysis to identify novel BphT1 binding region in *R. jostii* RHA1. As a result, we identified 9 ORFs as direct target of BphS1T1, which including IclR type transcriptional regulator, possible endonuclease, and some hypothetical proteins. This result indicated that BphS1T1 is a master regulator of biphenyl degradation, and directly activated to transcriptional regulator and endonuclease to regulate expression level of many ORFs in RHA1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：放線菌、環境汚染物質、ChIP-chip 解析、二成分制御系、転写制御因子

## 1. 研究開始当初の背景

ロドコッカス属細菌は、環境保全やバイオテクノロジーにおいて高い重要性を持つ、高

G+C の好気性グラム陽性の放線菌である。*Rhodococcus jostii* RHA1 株は環境汚染物質の一つであるポリ塩化ビフェニル (PCB) や

フタル酸エステル類を含む幅広い難分解性芳香族化合物を好氣的に分解する高い能力を持つ。さらに、ロドコッカス属細菌は土壤中での生存にも優れ、遺伝子操作が可能であることから、環境汚染を修復するバイオレメディエーション技術への高度な応用が期待されている。

2006年、ロドコッカス属細菌において世界で初めての例として、本菌株の全ゲノム配列が解読・公表された。RHA1株は、1つの線状染色体と3つの線状プラスミドからなる全長約9.7 Mb、9,145個のオープンリーディングフレーム(ORF)を有しており、アノテーションを基にした機能予測解析からRHA1株は他の菌群と比べて非常に多くの芳香族化合物代謝遺伝子群を有していることが明らかとなった。さらに全9,145 ORFに対応するオリゴヌクレオチドマイクロアレイが作製され、全ORFの網羅的な発現解析が可能となった。ビフェニルなどの芳香族化合物で生育した菌体の転写変動をマイクロアレイで網羅的に調べたところ、代謝酵素遺伝子群以外に非常に多くのORFの転写変動が認められた。この結果から、RHA1株の芳香族化合物代謝において、今までに詳細に解析されてきた代謝酵素遺伝子群とは異なるユニークな遺伝子群が未知の生理的な変化を引き起こしていることが予測されている。

現在までにRHA1株のビフェニル代謝の制御因子として、線状プラスミドpRHL1に存在するセンサーキナーゼ・BphS1およびレスポンスレギュレーター・BphT1からなる2成分制御系BphS1T1による転写制御が詳細に解析されてきた。BphS1T1はビフェニル初発酸化酵素遺伝子 *bphA1* プロモーター上流を始め、*etbD1*, *bphA4-2*, *etbA1*, *ebdA1* の5つのビフェニル代謝酵素遺伝子群のプロモーター領域をビフェニルに応答して活性化する能力を有することが明らかとなった。一方、*bphT1S1* に高い相同性を持つ2成分制御系として線状プラスミド pRHL2 に存在する *bphS2T2* が単離・解析された。センサーキナーゼ・BphS1 と BphS2 の基質応答性を調べた結果、BphS2 はビフェニルに応答しないことが明らかとなった。以上の結果から、RHA1株においてBphS1T1のみがビフェニル代謝遺伝子群を誘導することが明らかとなり、BphS1T1 がビフェニル代謝において非常に重要であることが示された。また、ビフェニルで生育したRHA1株のマイクロアレイ解析から、ビフェニルで生育した菌体においてビフェニル代謝に関与する遺伝子以外にも非常に多くのORFの転写変動が見られた。これらの結果は、BphT1S1 が現在までに知られているプロモーター領域以外の未知のプロモーター領域を活性化している可能性を強く示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究ではRHA1株におけるBphT1制御領域の網羅的解析を目指し、ChIP-chip法を用いて全ゲノム上でのBphT1の結合部位の同定を目的とする。一般的にChIP-chip法で用いられるアレイはタイリングアレイと呼ばれるゲノム全体を覆うようなオリゴヌクレオチドアレイを用いるのが一般的である。しかしロドコッカス属のような放線菌郡はG+C含量が非常に高く、特異的なオリゴヌクレオチドの選別が困難でありタイリングアレイの製作ができない。そこで、転写解析用に作成したオリゴヌクレオチドアレイを本研究に用いることとした。転写解析用オリゴヌクレオチドアレイは約12,000本のオリゴを有し、全長9.7 Mbに対して平均約800 bpに一本の特異的なオリゴヌクレオチドを持っている。従って、このDNAマイクロアレイを用いることで800 bpに1つの特異的なシグナルが得られ、RHA1株のゲノム全体におけるBphT1結合領域を選別することが可能である。また、ビフェニルで転写変動が確認され、新たにBphT1の標的として同定されたORFの生理学的意義を明らかにするために、遺伝子産物の生化学的解析および遺伝子破壊株の作製とその表現型の解析を行う。以上の解析を行うことで、本研究から現在までに知られている代謝酵素遺伝子群とは異なるロドコッカス属細菌のゲノム情報を基にした新規の生理学的な知見を得る

## 3. 研究の方法

### (1) *bphT2* 遺伝子破壊株の作製

RHA1株ゲノム中には *bphT1* とアミノ酸レベルで96%の相同性を示す *bphT2* が存在しており、BphT2はBphT1の機能を相補できる可能性が示唆されている。RHA1株では *pK18mobsacB* を用いた効率的な2回組み換え体の作製方法が確立されていることから、本法を用いて野生株で *bphT2* 遺伝子破壊株 ( $\Delta$  *bphT2*) を作製した。

### (2) BphT1抗体を用いた免疫沈降と全ゲノム増幅

*bphT2* 遺伝子破壊株を1/5LBで対数増殖期中期まで培養し、集菌の後10 mM ビフェニルを加えた。一時間後にホルムアルデヒドを加えDNAとタンパク質を架橋した。3 Mのグリシンを加え平衡化した後に再度集菌した。回収したペレットにBugBasterを加えて懸濁した後、超音波破碎機を用いて菌体を破碎、リゾチームを加えて溶菌させた。サンプルにPMSF、G-セファロースを加えて平衡化した後、BphT1抗体を加え4℃で1時間攪拌した。遠心し沈殿を回収した後、滅菌水とフェノールクロロホルムを加えてタンパク質を分解し、BphT1に特異的に結合しているDNA断片を回

収した。得られた DNA 断片を GenomePlex Complete Genome Amplification (WGA) kit (Sigma) を用いて増幅し、以降の解析に用いた。BphT1 抗体の非特異的結合を考慮して、ビフェニルを加えていない菌体から同様に DNA を調整し、0 時間のサンプルとした。

### (3) ラベリング、ハイブリダイゼーション

WGA によって増幅した断片のラベリングはアミノアシル dUTP を用いたインダイレクトラベリング法によって行った。RHA1 株は GC 含量が高いため、逆転写の際には通常のランダムヘキサマーとともに、70%GC のランダムヘキサマーを用いた。1 時間ビフェニルをさらしたサンプルと、ラベル化したゲノム DNA を等量混合し、RHA1 株の全ゲノムをカバーするオリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイゼーションし、蛍光強度を測定した。

### (4) 定量 PCR

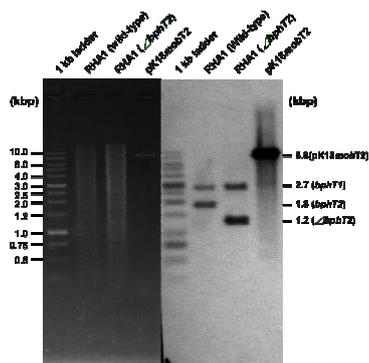
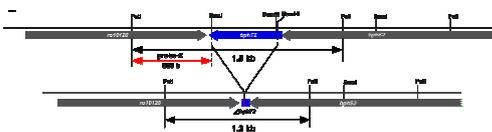
上記で得られた DNA 断片が、BphT1 に特異的に結合している領域が得られたことを確認するため、*bphA1*、*etbD1*、*bphA4-2*、*etbA1*、*ebdA1* プロモーター上流領域の定量 PCR を行った。定量 PCR は Cybr Green 法によって行い、ABI 4000B を用いてデータ解析した。

### (5) データ解析

マイクロアレイハイブリダイゼーションによって得られたデータは、arraypipe を用いてバックグラウンド補正、vsn を用いた標準化を行いデータの補正を行った。さらに Z score を算出し標準偏差からの解離を求め、Z score が 2 以上のデータを BphT1 が特異的に結合している領域と定義した。

## 4. 研究成果

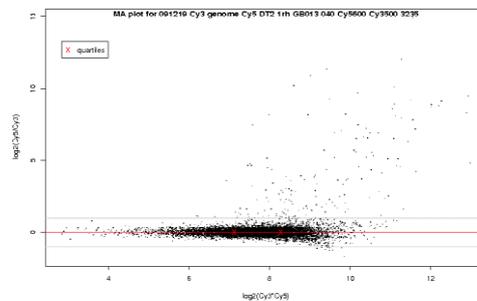
まず始めに、*bphT2* 遺伝子破壊株の構築を pK18*mobsacB* を用いた方法を用いて行った。以下にその結果を示す。



得られた *bphT2* 遺伝子破壊株を 1/5LB に植菌し、対数増殖期 ( $OD_{600} = 0.5$ ) まで培養した。研究方法に記した免疫沈降法を用いて BphT1 に特異的に結合している DNA 断片を取得した。

BphT1 に特異的に結合している DNA 断片が得られたのかどうかを確認するために、既知の BphT1 依存性誘導プロモーターである *bphA1*、*etbD1*、*bphA4-2*、*etbA1*、*ebdA1* プロモーター上流領域の定量 PCR を行った。その結果、1 時間後のサンプルにおいてコントロールである 0 時間のサンプルと比べて、それぞれ 3 倍程度多く含まれていたことから今回行った BphT1 抗体を用いた免疫沈降が成功していることを裏付ける結果となった。

コントロールとしてゲノム DNA を Cy3、1 時間ビフェニルにさらしたサンプルを Cy5 でラベル化し、オリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイズした。BphT1 の非特異的結合を考慮し、ビフェニルにさらしていないサンプルを同様にラベル化し、マイクロアレイにハイブリダイズした。



その結果、上記のような結果が得られ、さらに 1 時間のデータから 0 時間のデータを差し引くことで BphT1 が 1 時間後に特異的に結合している領域が同定された。BphT1 は 1 時間後に 107 カ所に結合していた。

現在までのビフェニルを唯一の炭素源とした場合とピルビン酸を唯一の炭素源とした場合のアレイ解析から、1000 以上の ORF の転写が有意に変動していることを明らかにしている。このデータと今回得られた ChIP-chip のデータを統合することで、BphT1 レギュロンの同定を試みた。その結果、9 カ所のデータの一致が認められこれらがビフェニル誘導 1 時間で BphT1 によって特異的に誘導される ORF であることが明らかとなった。この中には、既知の BphT1 誘導性プロモーターである *bphA1* および *etbA* が含まれている以外に、Ic1R 型転写レギュレーターが含まれており、BphT1 がビフェニル代謝酵素遺伝子群を直接転写活性化している以外に他の転写レギュレーターを活性化しているマスターレギュレーターとして機能していることが示された。さらにエンドリボヌクレアーゼの

転写活性化を担っていることが推定され、転写レギュレーターが転写物分解に関与するORFの転写誘導を行っていることが明らかとなり、転写制御と翻訳制御の両方を制御していることが示唆される興味深い結果となった。その他、いくつかの仮定タンパク質の転写活性化を担っていることも推定され、これらの機能についても更なる研究が必要であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①H. Hara, G. R. Stewart, and W. W. Mohn, Involvement of a novel ABC transporter and monoalkyl phthalate ester hydrolase in phthalate ester catabolism by *Rhodococcus jostii* RHA1. Appl. Environ. Microbiol. 2010. 76:1516-1523, 査読有

[学会発表] (計1件)

①肥後明佳、原啓文、大西康夫、堀之内末治、放線菌 *Streptomyces griseus* のグローバル転写因子 AdpA の ChIP-seq 解析、第4回ゲノム微生物学会、2010年3月9日、九州大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原 啓文 (HARA HIROFUMI)  
岡山理科大学・工学部・講師  
研究者番号：80511071

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：